

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12P 17/14 // C07D 273/00</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/20945</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	12. Juni 1997 (12.06.97)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05190</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. November 1996 (25.11.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 45 639.4 7. December 1995 (07.12.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JESCHKE, Peter [DE/DE]; Heymannstrasse 38, D-51373 Leverkusen (DE). BONSE, Gerhard [DE/DE]; Gerstenkamp 1, D-51061 Köln (DE). THIELKING, Gerhard [DE/DE]; Gebhardstrasse 11, D-51379 Leverkusen (DE). ETZEL, Winfried [DE/DE]; An der Wupper 33, D-42799 Leichlingen (DE). HARDER, Achim [DE/DE]; Europaring 54, D-51109 Köln (DE). MENCKE, Norbert [DE/DE]; Grundersmühle 2, D-51381 Leverkusen (DE). KLEINKAUF, Horst [DE/DE]; Baseler Strasse 17, D-12205 Berlin (DE). ZOCHER, Rainer [DE/DE]; Lauenburger Strasse 37, D-12169 Berlin (DE). IINUMA, Katsuharu [JP/JP]; 788, Kayama, Odawara-shi, Kanagawa-ken</p>		<p>250 (JP). MIYAMOTO, Kouichi [JP/JP]; 788, Kayama, Odawara-shi, Kanagawa-ken 250 (JP).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, KZ, LK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, TR, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	
<p>(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF SUBSTITUTED ARYL LACTIC ACID CONTAINING CYCLODEPSIPEPTIDES WITH 24 RING ATOMS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON SUBSTITUIERTEN ARYLMILCHSÄURE-HALTIGEN CYCLODEPSIPEPTIDEN MIT 24 RINGATOMEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a new process for the preparation of substituted aryl lactic acid containing cyclodepsipeptides with 24 ring atoms of the formula (I), in which R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> have the meanings given in the description, with the aid of fungal strains of the Agonomycetales class or enzymatic preparations isolated therefrom.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptiden mit 24 Ringatomen der Formel (I), in welcher R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> die in der Beschreibung angegebene Bedeutung haben, mit Hilfe von Pilzstämmen der Art Agonomycetales oder daraus isolierten enzymatischen Präparationen.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

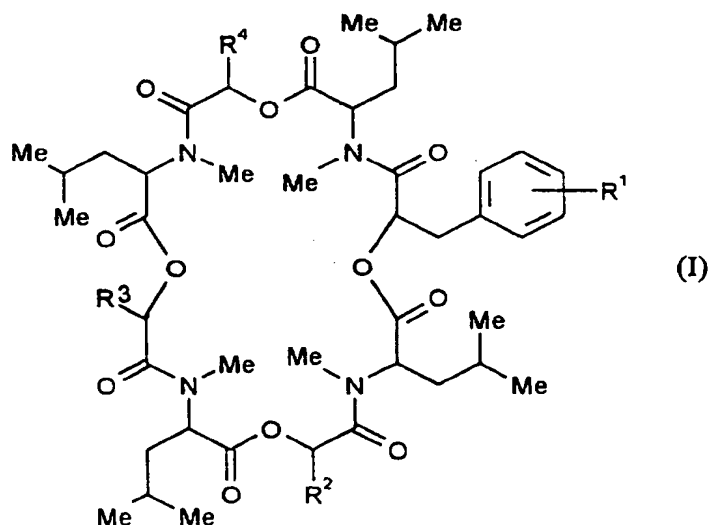
AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Verfahren zur Herstellung von substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptiden mit 24 Ringatomen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von teilweise bekannten substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptiden mit 24 Ringatomen.

Die Herstellung verschiedener cyclischer, Arylmilchsäure-haltiger Depsipeptide mit 24 Ringatomen nach mikrobiellen Verfahren, wie beispielsweise PF 1022A, PF 1022 B, PF 1022 C, PF 1022D und PF 1022E, ist bereits beschrieben (vgl. Fermentation von Cyclooktadepsipeptiden: PF 1022A aus *Mycelia sterilia* (FERM BP-2671; frühere Bezeichnung FERM P-10 504) in EP-OS 382 173; T. Sasaki et al., J. Antibiotics 45, 1992, S. 692-697; aus derselben Kultur wurden isoliert: PF 1022B, PF 1022C und PF 1022D: JP-Pat. 5 170 749; PF 1022E: JP-Pat. 6 184 126).

Die Verbindungen der PF 1022-Reihe besitzen die folgende Formel (I):



Bezeichnung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
PF 1022A	-H	-Methyl	-Benzyl	-Methyl
PF 1022B	-H	-Benzyl	-Benzyl	-Benzyl
PF 1022C	-H	-Methyl	-Benzyl	-Benzyl
PF 1022D	-H	-Methyl	-Methyl	-Methyl
PF 1022E	4-Hydroxy	-Methyl	-Benzyl	-Methyl

Es ist auch bereits bekannt, daß eine Reihe von cyclischen, Arylmilchsäure-haltigen Depsipeptiden mit 24 Ringatomen mittels chemisch synthetischen Verfahren darstellbar sind (vgl. Totalsynthesen von Cyclooctadepsipeptiden: JP-Pat. 5 229 997; JP-Pat. 5 320 1 48; Makoto Ohyama et al., Biosci. Biotech. Biochem. 58 (6), 1994, S. 1193-1194; Makio Kobayshi et al., Annu. Rep. Sankyo Res. Lab. 46, 1994, S. 67-75; Stephen J. Nelson et al., J. Antibiotics 47, (11), 1994, S. 1322-1327; J. Scherkenbeck et al. Tetrahedron 51 (31), 1995, S. 8459-8470 [PF 1022A]; WO 94/19334; WO 95/19053; EP-OS 634 408; EP-OS 626 375; EP-OS 626 376).

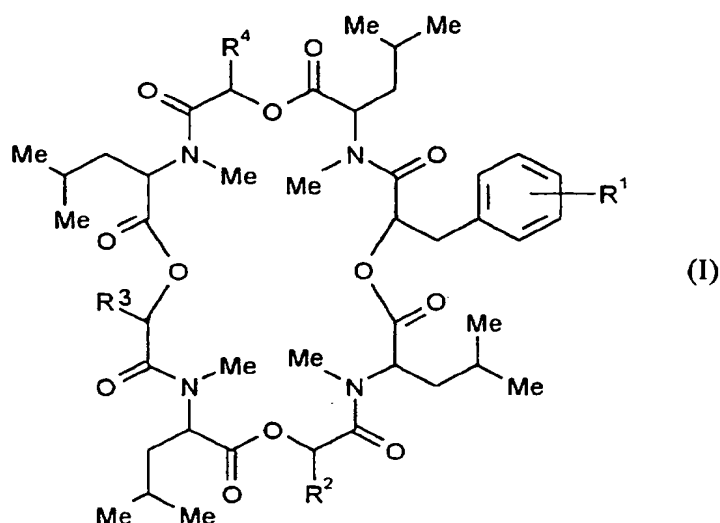
Weiterhin ist bekannt, daß bestimmte Arylmilchsäure-haltige Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen als Endoparasitizide verwendet werden können (vgl. z.B.: EP-OS 382; EP-OS 503 538; WO 93/19053; EP-OS 0 634 408; WO 94/19334; WO 95/07272; EP-OS 626 375; EP-OS 626 376).

Während chemisch synthetische Verfahren eine breite Variation des Substituenten R<sup>1</sup> im Phenylmilchsäurefragment bestimmter Cyclooctadepsipeptide ermöglichen (vgl.: WO 94/19334; WO 95/19053; EP-OS 634 408; EP-OS 626 375; EP-OS 626 376), entstanden bisher bei den mikrobiellen Verfahren nur bevorzugt die unsubstituierten D-Phenylmilchsäure-haltigen Cyclooctadepsipeptide (R<sup>1</sup> = -H; vgl.: PF 1022A, PF 1022B, PF 1022C und PF 1022D).

Außer der bereits genannten Fermentation des D-(4-Hydroxyphenyl)-milchsäure-haltigen Cyclooctadepsipeptids PF 1022E (R<sup>1</sup> = 4-Hydroxy; vgl.: JP-Pat. 6 184 126) ist somit über die fermentative Darstellung von weiteren, substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclooctadepsipeptiden bisher nichts bekannt geworden.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung substituierter Arylmilchsäure-haltiger Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen mit Hilfe von Pilzstämmen der Art Agonomycetales oder daraus isolierten enzymatischen Präparationen.

- 5 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen der allgemeinen Formel (I)



in welcher

- 10  $R^1$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, cyclisches Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkenyloxy, Arylalkoxy, Cycloalkoxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkylcarbonyl, Alkylcarbonyloxy, Alkoxy-carbonyl, Alkylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, Heteroarylcarbonyl, Alkoxy-sulfonyl, Alkylamino-sulfonyl, Dialkylaminosulfonyl, Alkylthio, Alkylsulfinyl, Alkylsulfonyl, Heteroarylsulfonyl, die gegebenenfalls substituiert sein können, Hydroxy, Halogen, Nitro, Amino, Carboxyl, Carbamoyl, Cyano oder gegebenenfalls  
15 für substituierte cyclische Aminogruppen, steht, und

- $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Heteroarylmethyl oder für einen Benzylrest stehen, der gegebenenfalls durch Reste aus der Reihe Wasserstoff, geradkettiges oder verzweigtes  
20 Alkyl, cyclisches Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkenyloxy, Arylalkoxy, Cycloalkoxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkylcarbonyl, Alkylcarbonyloxy,

5 Alkoxycarbonyl, Alkylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, Heteroaryl-carbonyl, Alkoxysulfonyl, Alkylaminosulfonyl, Dialkylaminosulfonyl, Alkylthio, Alkylsulfinyl, Alkylsulfonyl, Heteroarylsulfonyl, die gegebenenfalls substituiert sein können, Hydroxy, Halogen, Nitro, Amino, Carboxyl, Carbamoyl, Cyano oder der gegebenenfalls durch eine geeignete cyclische Aminogruppe substituiert ist, steht,

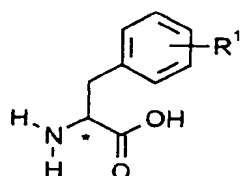
mit Ausnahme der Verbindungen der Formel (I), in welcher

$R^1$  für 4-Hydroxy steht,

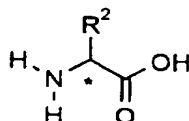
$R^3$  für unsubstituiertes Benzyl steht

10 und die übrigen Reste die oben genannte Bedeutung haben, dadurch hergestellt, daß man

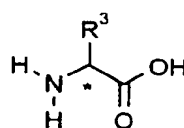
a) optisch aktive oder racemische Aminosäuren der allgemeinen Formeln (II), (III), (IV) und (V)



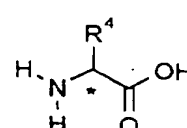
(II)



(III)



(IV)



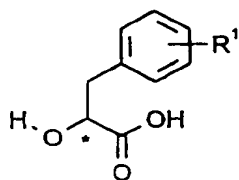
(V)

15

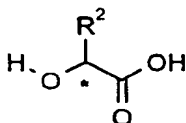
worin

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  die oben angegebene Bedeutung haben, oder

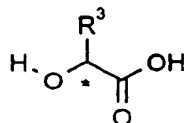
b) optisch aktive oder racemische 2-Hydroxy-carbonsäuren der allgemeinen Formeln (VI), (VII), (VIII) und (IX)



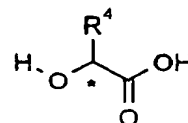
(VI)



(VII)



(VIII)



(IX)

worin

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  die oben angegebene Bedeutung haben,

- 5 in Gegenwart von Pilzstämmen der Art Agonomycetales in geeigneten Nährlösungen oder in Gegenwart von aus diesen Pilzstämmen isolierten Synthetasen in einem Puffersystem umgesetzt und anschließend die gewünschten, substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen isoliert.

- 10 Die Arylmilchsäure-haltigen cyclischen Depsipeptide mit 24 Ringatomen der allgemeinen Formel (I) sowie deren Säureadditionssalze und Metallsalz-Komplexe eignen sich hervorragend zur Bekämpfung von Endoparasiten, besonders auf dem Gebiet der Medizin und Veterinärmedizin.

- Gegebenenfalls substituiertes Alkyl allein oder als Bestandteil eines Restes in den allgemeinen Formeln bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielfhaft seien gegeben-  
 15 enfalls substituiertes Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1,1-Dimethylpropyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, Hexyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,2-Dimethyl-  
 20 butyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 1,1-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethylbutyl und 2-Ethylbutyl genannt. Vorzugsweise seien Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sec-Butyl und tert-Butyl genannt.

- 25 Gegebenenfalls substituiertes Alkenyl allein oder als Bestandteil eines Restes in den allgemeinen Formeln bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkenyl mit vor-

zugweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielfalls seien ge-  
gebenenfalls substituiertes Vinyl, 2-Propenyl, 2-Butenyl, 3-Butenyl, 1-Methyl-2-  
propenyl, 2-Methyl-2-propenyl, 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-2-  
butenyl, 2-Methyl-2-butenyl, 3-Methyl-2-butenyl, 1-Methyl-3-butenyl, 2-Methyl-3-  
5 butenyl, 3-Methyl-3-butenyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl,  
1-Ethyl-2-propenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-2-  
pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-2-pentenyl, 3-Me-  
thyl-3-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl, 1-Methyl-4-pentenyl, 2-Methyl-4-pentenyl,  
3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-butenyl, 1,1-Dimethyl-  
10 3-butenyl, 1,2-Dimethyl-2-butenyl, 1,2-Dimethyl-3-butenyl, 1,3-Dimethyl-2-  
butenyl, 1,3-Dimethyl-3-butenyl, 2,2-Dimethyl-3-butenyl, 2,3-Dimethyl-2-butenyl,  
2,3-Dimethyl-3-butenyl, 1-Ethyl-2-butenyl, 1-Ethyl-3-butenyl, 2-Ethyl-2-butenyl,  
2-Ethyl-3-butenyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl und  
1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl genannt. Vorzugsweise seien gegebenenfalls substi-  
15 tuiertes Ethenyl, 2-Propenyl, 2-Butenyl oder 1-Methyl-2-propenyl genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Cycloalkyl allein oder als Bestandteil eines Restes in  
den allgemeinen Formeln bedeutet mono-, bi- und tricyclisches Cycloalkyl, vor-  
zugsweise mit 3 bis 10, insbesondere mit 3, 5 oder 7 Kohlenstoffatomen.  
Beispielfalls seien gegebenenfalls substituiertes Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclo-  
20 pentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, Bicyclo[2.2.1]heptyl, Bicyclo[2.2.2]-  
oktyl und Adamantyl genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Alkoxy allein oder als Bestandteil eines Restes in  
den allgemeinen Formeln bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkoxy mit vor-  
zugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielfalls seien ge-  
25 gebenenfalls substituiertes Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, Isopropoxy, n-Butoxy,  
Isobutoxy, sec-Butoxy und tert-Butoxy genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Alkylthio allein oder als Bestandteil eines Restes in  
den allgemeinen Formeln bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkylthio mit  
vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielfalls seien  
30 gegebenenfalls substituiertes Methylthio, Ethylthio, n-Propylthio, Isopropylthio,  
n-Butylthio, Isobutylthio, sec-Butylthio und tert-Butylthio genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Alkoxycarbonyl allein oder als Bestandteil eines  
Restes in den allgemeinen Formeln bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alk-



oxycarbonyl mit vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielfhaft seien gegebenenfalls substituiertes Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, n-Propoxycarbonyl, Isopropoxycarbonyl, n-Butoxycarbonyl, Isobutoxycarbonyl, sec-Butoxycarbonyl und tert-Butoxycarbonyl genannt.

- 5 Gegebenenfalls substituiertes Alkylcarbonyl allein oder als Bestandteil eines Restes in den allgemeinen Formeln bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkylcarbonyl mit vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielfhaft seien gegebenenfalls substituiertes Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n-Propylcarbonyl, Isopropylcarbonyl, n-Butylcarbonyl, Isobutylcarbonyl, sec-  
10 Butylcarbonyl und tert-Butylcarbonyl genannt.

- Gegebenenfalls substituiertes Arylalkyl in den allgemeinen Formeln bedeutet vorzugsweise gegebenenfalls im Arylteil und/oder Alkyl substituiertes Arylalkyl mit vorzugsweise 6 oder 10, insbesondere 8 Kohlenstoffatomen im Arylteil (vorzugsweise Phenyl oder Naphthyl, insbesondere Phenyl) und vorzugsweise 1 bis 4, ins-  
15 besondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, wobei der Alkylteil geradkettig oder verzweigt sein kann. Beispielfhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Benzyl und Phenylethyl genannt.

- Gegebenenfalls substituiertes Hetaryl allein oder als Bestandteil eines Restes in den allgemeinen Formeln bedeutet 5- bis 7-gliedrige Ringe mit vorzugsweise 1 bis  
20 3, insbesondere 1 oder 2 gleichen oder verschiedenen Heteroaromaten. Als Heteroatome in den Heteroaromaten stehen Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff. Beispielfhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Furyl, Thienyl, Pyrazolyl, Imidazolyl, 1,2,3- und 1,2,4-Triazolyl, Isoxazolyl, Thiazolyl, Isothiazolyl, 1,2,3-, 1,3,4-, 1,2,4- und 1,2,5-Oxadiazolyl, Azepinyl, Pyrrolyl,  
25 Pyridyl, Piperazinyl, Pyridazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazinyl, 1,3,5-, 1,2,4- und 1,2,3-Triazinyl, 1,2,4-, 1,3,2-, 1,3,6- und 1,2,6-Oxazinyl, Oxepinyl, Thiepinyl und 1,2,4-Diazepinyl genannt.

- Die gegebenenfalls substituierten Reste der allgemeinen Formeln können einen oder mehrere, vorzugsweise 1 bis 3, insbesondere 1 bis 2 gleiche oder verschiedene Substituenten tragen. Als Substituenten seien beispielfhaft und vorzugsweise  
30 aufgeföhrt:

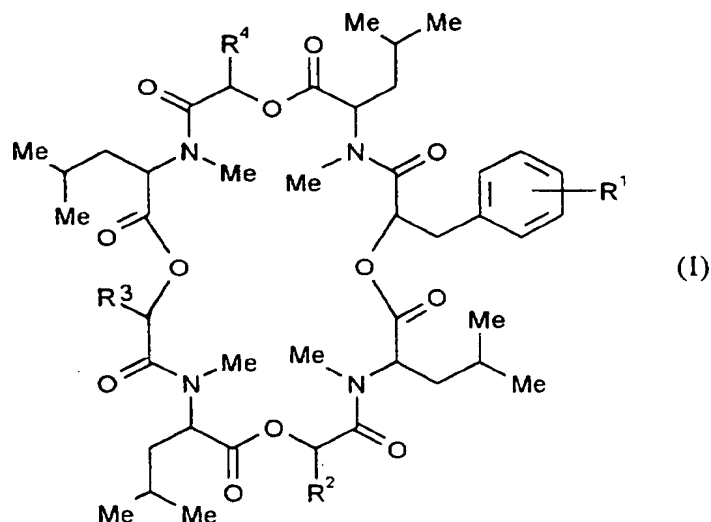
Alkyl mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sec-Butyl und tert-Butyl; Alkoxy mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen, wie Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, Isopropoxy, n-Butoxy, Isobutoxy, sec-Butoxy und tert-Butoxy; Alkylthio wie Methylthio, Ethylthio, n-Propylthio, Isopropylthio, n-Butylthio, Isobutylthio, sec-Butylthio und tert-Butylthio; Halogenalkyl mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen und vorzugsweise 1 bis 5, insbesondere 1 bis 3 Halogenatomen, wobei die Halogenatome gleich oder verschieden sind und als Halogenatome, vorzugsweise Fluor, Chlor oder Brom, insbesondere Fluor oder Chlor stehen, wie Difluormethyl, Trifluormethyl, Trichlormethyl; Hydroxy; Halogen, vorzugsweise Fluor, Chlor, Brom und Iod, insbesondere Fluor und Chlor; Cyan; Nitro; Amino; Monoalkyl- und Dialkylamino mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen je Alkylgruppe, wie Methylamino, Methylethylamino, Dimethyl-amino, n-Propylamino, Isopropylamino, Methyl-n-butylamino; Alkylcarbonylreste wie Methylcarbonyl; Alkoxycarbonyl mit vorzugsweise 2 bis 4, insbesondere 2 bis 3 Kohlenstoffatomen wie Methoxycarbonyl und Ethoxycarbonyl; Alkylsulfinyl mit 1 bis 4, insbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen; Halogensulfinyl mit 1 bis 4, insbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen und 1 bis 5 Halogenatomen wie Trifluormethylsulfinyl; Sulfonyl ( $-SO_2-OH$ ); Alkylsulfonyl mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, wie Methylsulfonyl und Ethylsulfonyl oder Halogenalkylsulfonyl mit 1 bis 4, insbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen und 1 bis 5 Halogenatomen wie Trifluormethylsulfonyl.

Als geeignete cyclische Aminogruppen kommen heteroaromatische oder aliphatische Ringsysteme mit einem oder mehreren Stickstoffatomen als Heteroatom in Frage, bei denen die Heterocyclen gesättigt oder ungesättigt, ein Ringsystem oder mehrere kondensierte Ringsysteme sein können, und gegebenenfalls weitere Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel u.s.w. enthalten. Außerdem können cyclische Aminogruppen auch ein Spiroring oder ein verbrücktes Ringsystem bedeuten. Die Anzahl der Atome, die cyclische Aminogruppen bilden, ist nicht beschränkt, beispielsweise bestehen sie im Falle eines Einringsystems aus 3 bis 8 Atomen und im Falle eines Dreiringssystems aus 7 bis 11 Atomen.

Beispielhaft für cyclische Aminogruppen seien gesättigte und ungesättigte monocyclische Ringsysteme mit einem Stickstoffatom als Heteroatom wie 1-Azetidinyl, Pyrrolidino, 2-Pyrrolin-1-yl, 1-Pyrrolyl, Piperidino, 1,4-Dihydropyridin-1-yl,

1,2,5,6-Tetrahydropyridin-1-yl, Homopiperidino genannt; beispielhaft für cyclischen Aminogruppen seien gesättigten und ungesättigten monocyclischen Ringsysteme mit zwei oder mehreren Stickstoffatomen als Heteroatome wie 1-Imidazolidinyl, 1-Imidazolyl, 1-Pyrazolyl, 1-Triazolyl, 1-Tetrazolyl, 1-Piperazinyl, 1-Homopiperazinyl, 1,2-Dihydropyridazin-1-yl, 1,2-Dihydropyrimidin-1-yl, Perhydropyrimidin-1-yl und 1,4-Diazacycloheptan-1-yl genannt; beispielhaft für cyclischen Aminogruppen seien gesättigten und ungesättigten monocyclischen Ringsysteme mit einem bis drei Stickstoffatomen und einem bis zwei Sauerstoffatomen als Heteroatome wie Oxazolidin-3-yl, Isoxazolin-2-yl, Morpholino oder 2,6-Dimethylmorpholino genannt; beispielhaft für cyclische Aminogruppen seien gesättigte und ungesättigte monocyclische Ringsysteme mit einem bis drei Stickstoffatomen und einem bis zwei Schwefelatomen als Heteroatome genannt; beispielhaft für cyclischen Aminogruppen seien gesättigte und ungesättigte kondensierten cyclische Ringsystemen wie Indol-1-yl, 1,2-Dihydro-benzimidazol-1-yl, Perhydropyrrolo-[1,2-a]pyrazin-2-yl genannt; beispielhaft für cyclischen Aminogruppen seien spirocyclische Ringsysteme wie das 2-Azaspiro[4,5]-decan-2-yl genannt; beispielhaft für cyclischen Aminogruppen seien verbrückte heterocyclische Ringsysteme wie das 2-Azabicyclo[2,2,1]heptan-7-yl genannt.

Die erfindungsgemäßen herstellbaren substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclopeptides mit 24 Ringatomen sind durch die allgemeine Formel (I) allgemein definiert.



Bevorzugt hergestellt werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I),

in welcher

- 5  $R^1$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, cyclisches Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, insbesondere Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Alkoxy, insbesondere Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, Butoxy, Isobutoxy, sec-Butoxy, tert-Butoxy, Cycloalkoxy, insbesondere Cyclopropyloxy, Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Dioxoalkylen, insbesondere Dioxomethylen, Alkylamino, insbesondere Methylamino, Ethylamino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, Diethylamino, Alkoxycarbonyl, insbesondere Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert-Butoxycarbonyl, Alkylaminocarbonyl, insbesondere Methylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, insbesondere Dimethylaminocarbonyl, Alkylaminosulfonyl, insbesondere Methylaminosulfonyl, Dialkylaminosulfonyl, insbesondere Dimethylaminosulfonyl, Alkylthio, insbesondere Methylthio oder tert-Butylthio, Alkylsulfinyl, insbesondere Methylsulfinyl oder tert-Butylsulfinyl, Alkylsulfonyl, insbesondere Methylsulfonyl oder tert-Butylsulfonyl, Heteroarylsulfonyl, insbesondere N-Morpholinosulfonyl oder N-Pyrazolylsulfonyl, die gegebenenfalls substituiert sein können, Hydroxy, Halogen, insbesondere Brom, Chlor, Fluor oder Iod, Nitro, Amino, Carboxyl, Carbamoyl, Cyano oder gegebenenfalls für substituierte cyclische Aminogruppen, insbesondere N-Pyrrolidino, N-Piperidino, N-Morpholino, N-(2,6-Dimethyl-morpholino), N-Methylpiperazino, N-Thiomorpholino oder N-Dioxothiomorpholino, steht, und
- 25  $R^2$  und  $R^4$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methyl, stehen, und
- 30  $R^3$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methyl, oder für einen Benzylrest steht, der gegebenenfalls durch Reste aus der Reihe Wasserstoff, geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, cyclisches Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, insbesondere Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Alkoxy, insbesondere Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, Butoxy, Isobutoxy, sec-Butoxy, tert-Butoxy, Cycloalkoxy, insbesondere

Cyclopropyloxy, Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Dioxoalkylen, insbesondere Dioxomethylen, Alkylamino, insbesondere Methylamino, Ethylamino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, Diethylamino, Alkoxy-carbonyl, insbesondere Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert-Butoxycarbonyl, Alkylaminocarbonyl, insbesondere Methylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, insbesondere Dimethylaminocarbonyl, Alkylaminosulfonyl, insbesondere Methylaminosulfonyl, Dialkylaminosulfonyl, insbesondere Dimethylaminosulfonyl, Alkylthio, insbesondere Methylthio oder tert-Butylthio, Alkylsulfinyl, insbesondere Methylsulfinyl oder tert-Butylsulfinyl, Alkylsulfonyl, insbesondere Methylsulfonyl oder tert-Butylsulfonyl, Heteroarylsulfonyl, insbesondere N-Morpholinosulfonyl oder N-Pyrazolylsulfonyl, die gegebenenfalls substituiert sein können, Hydroxy, Halogen, insbesondere Brom, Chlor, Fluor oder Iod, Nitro, Amino, Carboxyl, Carbamoyl, Cyano oder der gegebenenfalls durch eine geeignete cyclische Aminogruppe, insbesondere N-Pyrrolidino, N-Piperidino, N-Morpholino, N-(2,6-Dimethyl-morpholino), N-Methylpiperazino, N-Thiomorpholino oder N-Dioxothiomorpholino, substituiert ist, steht,

mit Ausnahme der Verbindungen der Formel (I), in welcher

R<sup>1</sup> für 4-Hydroxy steht,

R<sup>3</sup> für unsubstituiertes Benzyl steht

und die übrigen Reste die oben genannten Bedeutungen haben.

Besonders bevorzugt werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt,

in welcher

R<sup>1</sup> für Alkoxy, insbesondere Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, Butoxy, Isobutoxy, sec-Butoxy, tert-Butoxy, Alkylamino, insbesondere Methylamino, Ethylamino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, Diethylamino, Hydroxy, Halogen, insbesondere Brom, Chlor, Fluor oder Iod, Nitro, Amino, gegebenenfalls für substituierte cyclische Aminogruppen, insbesondere N-Morpholino, N-Methylpiperazino oder N-Dioxothiomorpholino, steht, und

$R^2$  und  $R^4$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methyl, stehen, und

5  $R^3$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methyl, oder für einen Benzylrest steht, der gegebenenfalls durch Reste aus der Reihe Wasserstoff, Alkoxy, insbesondere Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, Butoxy, Isobutoxy, sec-Butoxy, tert-Butoxy, Alkylamino, insbesondere Methylamino, Ethylamino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, Diethylamino, Hydroxy, Halogen, insbesondere Brom, Chlor, Fluor oder Iod, Nitro, Amino oder der gegebenenfalls  
10 durch eine geeignete cyclische Aminogruppe, insbesondere N-Morpholino, N-Methylpiperazino oder N-Dioxothiomorpholino, substituiert ist, steht,

mit Ausnahme der Verbindungen der Formel (I), in welcher

$R^1$  für 4-Hydroxy steht,

$R^3$  für unsubstituiertes Benzyl steht

15 und die übrigen Reste die oben angegebene Bedeutung haben.

Ganz besonders bevorzugt werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt,

in welcher

20  $R^1$  für Alkoxy, insbesondere Methoxy, tert-Butoxy, Hydroxy, Halogen, insbesondere Brom, Chlor, Fluor oder Iod, Nitro, Amino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, oder gegebenenfalls für substituierte cyclische Aminogruppen, insbesondere N-Morpholino, steht, und

$R^2$  und  $R^4$  für Methyl stehen, und

25  $R^3$  für einen Benzylrest steht, der gegebenenfalls durch Reste aus der Reihe Wasserstoff, Alkoxy, insbesondere Methoxy, tert-Butoxy, Hydroxy, Halogen, insbesondere Brom, Chlor, Fluor oder Iod, Nitro, Amino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, oder der gegebenenfalls durch

eine geeignete cyclische Aminogruppe, insbesondere N-Morpholino, substituiert ist, steht,

mit Ausnahme der Verbindungen der Formel (I), in welcher

R<sup>1</sup> für 4-Hydroxy steht,

5 R<sup>3</sup> für unsubstituiertes Benzyl steht

und die übrigen Reste die oben angegebene Bedeutung haben.

Unter den erfindungsgemäßen Herstellungsbedingungen entstehen die optisch aktiven, stereoisomeren Formen der Verbindungen der allgemeinen Formel (I). Vorzugsweise werden jedoch Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gebildet, in denen die  $\alpha$ -Aminosäuren eine (S)-Konfiguration (L-Form) und die 2-Hydroxycarbonsäuren eine (R)-Konfiguration (D-Form) aufweisen.

Im einzelnen seien folgende optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen Formel (I) genannt:

15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

25 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-amino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)



- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-hydroxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- 5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-methoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-tert-butoxy-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 25 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-N-morpholino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- 15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-dimethylamino-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 25

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-iodphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

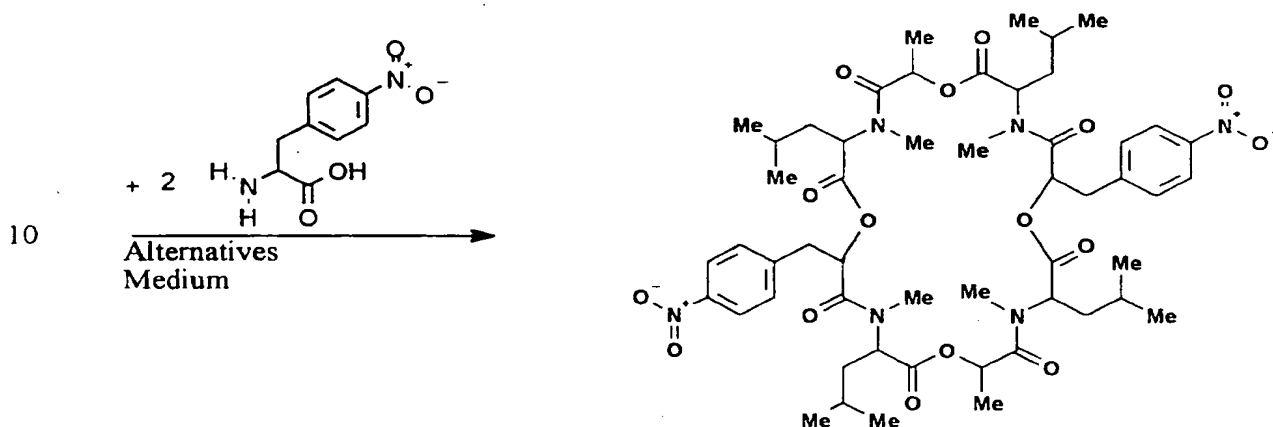
Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)

- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 5 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 10 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-4-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- 15 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- 20 Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-3-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-3-chlor-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-chlorphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)
- Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-bromphenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-2-chlorophenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-2-chlorophenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-)

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind teilweise bekannt (vgl. z.B.: WO 94/19334; WO 95/19053; EP-OS 634 408; EP-OS 626 375; EP-OS 626 376).

- 5 Setzt man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren a zur Herstellung der substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen (I) als Aminosäuren der Formel (II) 4-Nitrophenyl-alanin ( $R^1 = 4\text{-NO}_2$ ) ein, so läßt sich das Verfahren z.B. durch folgendes Reaktionsschema wiedergeben:



- 15 Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens a als Ausgangsstoffe benötigten Aminosäuren sind durch die Formeln (II) bis (V) allgemein definiert. In diesen Formeln stehen  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  vorzugsweise für diejenigen Reste, die bereits im Zusammenhang mit der Beschreibung der erfindungsgemäßen Stoffe der Formel (I) als bevorzugt für diese Substituenten genannt wurden.

- 20 Die als Ausgangsstoffe verwendeten natürlichen oder synthetischen Aminosäuren können, falls chiral, in der (S)- oder (R)-Konfiguration (L- oder D-Form) vorliegen. Bevorzugt sind jedoch (S)-konfigurierte  $\alpha$ -Aminosäuren.

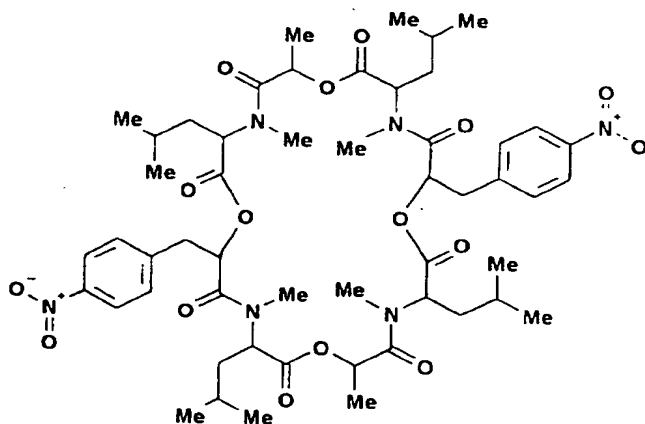
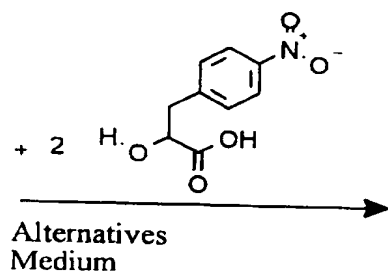
Beispielsweise seien genannt:

- 25 Aad, Abu, jAbu, ABz, 2ABz,  $\epsilon$ Aca, Ach, Acp, Adpd, Ahb, Aib,  $\beta$ Aib, Ala,  $\beta$ Ala,  $\Delta$ Ala, Alg, All, Ama, Amt, Ape, Apm, Apr, Arg, Asn, Asp, Asu, Aze, Azi, Bai, Bph, Can, Cit, Cys, (Cys)<sub>2</sub>, Cyta, Daad, Dab, Dadd, Dap, Dapm, Dasu, Djen, Dpa, Dtc, Fel, Gln, Glu, Gly, Guv, hAla, hArg, hCys, hGln, hGlu, His, hIle, hLeu,

hLys, hMet, hPhe, hPro, hSer, hThr, hTrp, hTyr, HyI, Hyp, 3Hyp, Ile, Ise, Iva, Kyn, Lant, Lcn, Leu, Lsg, Lys,  $\beta$ Lys,  $\Delta$ Lys, Met, Mim, Min, nArg, Nle, Nva, Oly, Orn, Pan, Pec, Pen, Phe, Phg, Pic, Pro,  $\Delta$ Pro, Pse, Pse, Pya, Pyr, Pza, Qin, Ros, Sar, Sec, Sem, Ser, Thi,  $\beta$ Thi, Thr, Thy, Thx, Tia, Tle, Tly, Trp, Trta, Tyr, Val, Nal, Tbg, Npg, Chg, Thia (vgl. z.B. Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band XV/1 und 2, Stuttgart, 1974).

Bevorzugt seien jedoch substituierte Phenylalanine (Phe) genannt. In den substituierten Phenylalaninen der allgemeinen Formel (II) steht  $R^1$  vorzugsweise für denjenigen Rest, der bereits im Zusammenhang mit der Beschreibung der erfindungsgemäßen Stoffe der Formel (I) als bevorzugt für diesen Substituenten genannt wurde.

Setzt man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren b zur Herstellung der substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen (I) als 2-Hydroxycarbonsäuren der Formel (VI) 4-Nitrophenyl-milchsäure ( $R^1 = 4\text{-NO}_2$ ) ein, so läßt sich das Verfahren b z. B. durch folgendes Reaktionsschema wiedergeben:



Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens b als Ausgangsstoffe benötigten 2-Hydroxy-carbonsäuren sind durch die Formeln (VI) bis (IX) allgemein definiert.

In diesen Formeln stehen  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  vorzugsweise für diejenigen Reste, die bereits im Zusammenhang mit der Beschreibung der erfindungsgemäßen Stoffe der Formel (I) als bevorzugt für diese Substituenten genannt wurden.



Die als Ausgangsstoffe verwendeten 2-Hydroxy-carbonsäuren können, falls chiral, in der (S)- oder (R)-Konfiguration (L- oder D-Form) vorliegen. Bevorzugt sind jedoch die (S)-konfigurierten 2-Hydroxy-carbonsäuren.

Beispielsweise seien genannt:

- 5 Hyac, Hyba, Hydd, Hyde, Hyic, Hyiv, Hymb, Hypp, Hypr (Lac), Hytd, Hyud, Hyva, PhLac (vgl. z.B. Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band XV/1 und 2, Stuttgart, 1974).

- 10 Bevorzugt seien jedoch substituierte Phenylmilchsäuren (PhLac) genannt. In den substituierten Phenylmilchsäuren der allgemeinen Formel (VI) steht  $R^1$  vorzugsweise für denjenigen Rest, der bereits im Zusammenhang mit der Beschreibung der erfindungsgemäßen Stoffe der Formel (I) als bevorzugt für diesen Substituenten genannt wurde.

Als geeigneter Pilzstamm zur Durchführung der beiden erfindungsgemäßen Verfahren a und b sei Mycelia sterilia der Art Agonomycetales genannt.

- 15 Insbesondere sei der am 30.11.1995 unter der Nummer DSM 10 345 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DMS) in Braunschweig gemäß Budapester Vertrag hinterlegte Pilzstamm Mycelia sterilia 541-11 genannt.

- 20 Das Verfahren kann auch mit aus Mikroorganismen isolierten Synthetasen durchgeführt werden. Die dafür benötigten Cyclodepsipeptid-Synthetasen können aus dem weiter oben genannten Pilzstamm nach literaturbekannten Verfahren isoliert werden (vgl. z. B. Isolierung von Enniatinsynthetasen: R. Pieper, H. Kleinkauf, R. Zocher, J. Antibiotics 45, 1993, S. 1273-1277; DE-A 4 406 025).

- 25 Die Fermentation der Pilzstämmen der Art Agonomycetales erfolgt nach an sich bekannten Methoden in Gegenwart geeigneter Nährlösungen. Diese Nährlösungen enthalten die für das Wachstum der Pilze notwendigen Salze sowie Kohlenstoff- und Stickstoffquellen.

Als geeignete organische Salze zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen alle Alkali-, Erdalkali- und Metall-Salze mit Elementen der II. bis VIII. Nebengruppe des Periodensystems in Frage.

5 Beispielhaft seien dafür erwähnt die Acetate, Chloride, Bromide, Iodide, Fluoride, Nitrate, Nitrite, Phosphate, Hydrogenphosphate, Dihydrogenphosphate, Phosphite, Hydrogenphosphite, Sulfate, Hydrogensulfate, Sulfite, Hydrogensulfite, Karbonate, Hydrogenkarbonate des Lithiums, Natriums, Kaliums, Caesiums, Magnesiums, Calciums, Bariums, Zinks, Cadmiums, Scandiums, Titans, Zirkoniums, Vanadiums, Niobs, Chroms, Molybdäns, Mangans, Eisen, Cobalts oder Nickels.

10 Vorzugsweise verwendet man die Acetate, Halogenide, Phosphate, Hydrogenphosphate, Dihydrogenphosphate, und Nitrate der Erdalkalimetalle, insbesondere Magnesium, und Metalle der II., VII. und VIII. Nebengruppe des Periodensystems, beispielsweise Zink, Mangan und Eisen.

Als Kohlenstoffquelle zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen Kohlenhydrate und kohlenhydrathaltige Produkte in Frage.

15 Beispielhaft seien dafür erwähnt die Monosaccharide wie Pentosen, insbesondere Ribose, die Hexosen, insbesondere Glucose und Fructose, die Oligosaccharide wie Disaccharide, insbesondere Saccharose, Maltose und Lactose, die Trisaccharide, insbesondere Raffinose, sowie die Tetra-, Penta- und Hexasaccharide.

Vorzugsweise verwendet man Monosaccharide wie beispielsweise Hexosen, insbesondere Glucose, und Oligosaccharide wie beispielsweise Disaccharide, insbesondere Saccharose.

20 Als Stickstoff-Quelle zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen Aminosäuren und stickstoffhaltige Salze in Frage.

Beispielhaft seien dafür die weiter oben genannten natürlichen und synthetischen Aminosäuren erwähnt oder stickstoffhaltige Salze wie Ammoniumnitrat, Ammoniumnitrit oder Nitrate und Nitrite der weiter oben genannten Metalle.

25 Vorzugsweise verwendet man die weiter oben genannten natürlichen Aminosäuren sowie stickstoffhaltige Salze wie Ammoniumnitrat.

Die für das fermentative Verfahren verwendeten Pilzstämme werden zunächst nach an sich bekannten Methoden in einem Medium, bestehend z. B. aus Melasse/Corn-steep-Liquor, angezüchtet. Nach erfolgter Kultivation wird das Mycel isoliert. Zur

5 Darstellung der Vorkultur wird ein Fusarium definiertes Medium (FDM), bestehend aus einer Kohlenstoff-Quelle und anorganischen Salzen, mit Mycel angimpft und erneut fermentiert. Nach wenigen Tagen kann die FDM-Hauptkultur durch Überimpfen von je 1 ml Vorkultur hergestellt und analog fermentiert werden.

Die eigentliche Fermentation wird dann in Gegenwart von Verbindungen der Formeln (II) bis (V) oder (VI) bis (IX) durchgeführt.

10 Die Fermentationsdauer beträgt 1 bis 30 Tage. Die Fermentation erfolgt bei Temperaturen zwischen +5°C und +40°C, bevorzugt zwischen +15°C und +35°C, besonders bevorzugt zwischen +25°C und +30°C. Es wird steril und unter Normaldruck gearbeitet.

Zur Durchführung werden die Verbindungen der Formeln (II) bis (V) oder (VI) bis (IX) im allgemeinen in einer Konzentration von 5 mM bis 100 mM, vorzugsweise 5 mM bis 70 mM eingesetzt.

15 Nach vollendeter Fermentation wird das Mycel der Kultur abgetrennt, das Filtrat gegebenenfalls mehrmals mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, homogenisiert und anschließend filtriert. Das anfallende Kulturfiltrat wird in üblicher Weise extrahiert, getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

20 Die anfallenden Cyclodepsipeptid-Rohprodukte lassen sich in üblicher Weise durch Säulenchromatographie oder durch Craig-Verteilung reinigen. Welches das optimale Verfahren ist, muß von Fall zu Fall entschieden werden. (vgl. auch die Herstellungsbeispiele).

25 Wird das erfindungsgemäße Verfahren in Gegenwart von isolierten Cyclodepsipeptid-Synthetasen durchgeführt, wird in einem wäßrigen Puffersystem in Gegenwart von Metallsalzen, S-Adenosyl-L-methionin (SAM) und Adenosintriphosphat (ATP) gearbeitet.

30 Als Metallsalze seien genannt: Acetate, Chloride, Bromide, Iodide, Fluoride, Nitrate, Phosphate, Hydrogenphosphate, Phosphite, Hydrogenphosphite, Sulfate, Hydrogensulfate, Sulfite, Hydrogensulfite, Carbonate und Hydrogencarbonate des Lithiums, Natriums, Kaliums, Caesiums, Magnesiums, Calciums oder Bariums.

Vorzugsweise verwendet man Erdalkalimetall-Salze, wie beispielsweise Magnesiumchlorid, -sulfat oder -acetat.

Die erfindungsgemäßen Verfahren a und b werden in einer wässrigen Pufferlösung durchgeführt.

- 5 Beispielhaft seien dafür kommerziell erhältliche Pufferlösungen erwähnt, z.B. für den pH-Wert 1,0, insbesondere Glycin-Salzsäure, für den pH-Wert 2,0 bis 4,0, insbesondere Citrat-Salzsäure, für den pH-Wert 5,0 bis 6,0, insbesondere Citrat-Natronlauge, für den pH-Wert 7,0, insbesondere Phosphat, für den pH-Wert 8,0, insbesondere Borat-Salzsäure, und für den pH-Wert 9,0 bis 10,0, insbesondere  
10 Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge.

Vorzugsweise arbeitet man im "physiologischen Bereich", d. h. bei einem pH-Wert von 6,0 bis 9,5 und verwendet dafür bevorzugt eine Phosphatpufferlösung, insbesondere Kaliumhydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat oder Kaliumhydrogenphosphat/Dikaliumhydrogenphosphat.

- 15 Zur Durchführung werden im allgemeinen 2 mM bis 8 mM, vorzugsweise 3 mM bis 5 mM an Verbindungen der Formeln (II) bis (V) oder (VI) bis (IX), S-Adenosyl-L-methionin (SAM), 3 mM bis 9 mM vorzugsweise 4 mM bis 6 mM Adenosintriphosphat (ATP), und 2 mM bis 25 mM, vorzugsweise 5 mM bis 15 mM an Erdalkalimetall-Salz, 10 mM bis 100 mM, vorzugsweise 40 mM bis  
20 60 mM Puffer mit 100 µg bis 1000 µg, vorzugsweise 200 µg bis 600 µg isolierter Cyclodepsipeptid-Synthetase in-vitro eingesetzt.

- Die Reaktionsdauer der enzymatischen in-vitro-Synthese beträgt 2 Minuten bis 24 Stunden. Die enzymatische in-vitro-Synthese erfolgt bei einem Temperaturbereich von 0°C bis +50°C, vorzugsweise bei +10°C bis +35°C, besonders bevorzugt zwischen +20°C und +30°C.  
25

Sie verläuft in einem pH-Bereich von 6,5 bis 9,5, vorzugsweise bei 7,0 bis 8,0, wobei der pH-Wert durch Zugabe eines Puffers während der gesamten Reaktion bei 7,3 konstant gehalten wird.

- Vorzugsweise arbeitet man unter sterilen Reaktionsbedingungen und bei Normaldruck.  
30

Die enzymatische in-vitro-Synthese kann durch Zugabe von Wasser gestoppt werden.

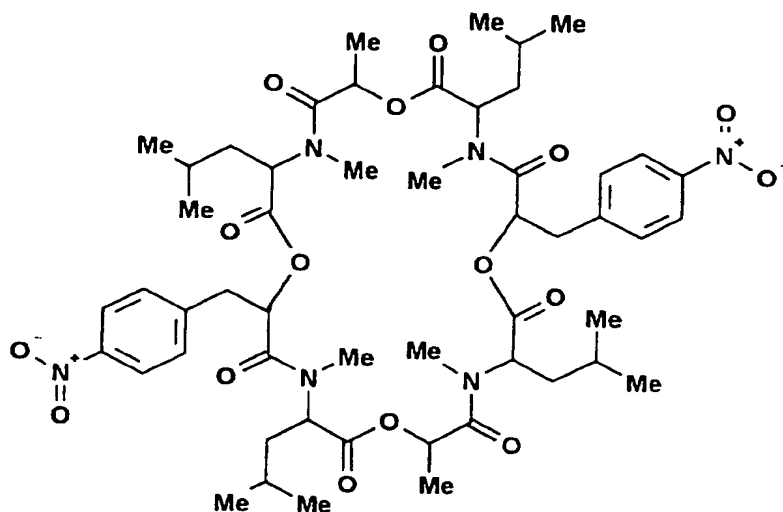
5 Im Falle der Verwendung von Verbindungen der Formeln (II) bis (V) ist es jedoch vorteilhaft die enzymatische in-vitro-Synthese in Gegenwart der entsprechenden Transaminasen bzw. Dehydrogenasen durchzuführen.

Zur Aufarbeitung wird die wässrige Phase mehrmals mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

10 Die anfallenden Cyclodepsipeptid-Rohprodukte lassen sich in üblicher Weise durch Säulenchromatographie oder durch Craig-Verteilung reinigen. Welches das optimale Verfahren ist, muß auch hier von Fall zu Fall entschieden werden (vgl. auch die Herstellungsbeispiele).

**Herstellungsbeispiele****Beispiel 1:**

**Cyclo(-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-nitro-phenyllactyl-N-methyl-L-leucyl-D-lactyl-N-methyl-L-leucyl-D-4-nitro-phenyllactyl-)**

**Herstellung nach Verfahren a****In-vivo-Incorporation von 4-Nitro-phenylalanin:**

Zu einer 3 Tage alten Hauptkultur von Mycelia sterilia der Art Agonomycetales wird 4-Nitro-phenylalanin in einer Konzentration von 50 mM steril zugegeben und die Fermentation noch 3 Tage fortgesetzt. Danach wird das Mycel der Fusarienkultur abgetrennt und nach Gefriertrocknung mehrmals mit Methanol extrahiert. Anschließend werden die gesammelten organischen Phasen zur Trockne eingedampft.

**Herstellung nach Verfahren b****In-vivo-Incorporation von 4-Nitro-phenylmilchsäure:**

Zu einer 3 Tage alten Hauptkultur von Mycelia sterilia der Art Agonomycetales wird 4-Nitro-phenylmilchsäure in einer Konzentration von 50 mM steril zugegeben und die Fermentation noch 3 Tage fortgesetzt. Danach wird das Mycel der Fusarienkultur abgetrennt und nach Gefriertrocknung mehrmals mit Methanol

extrahiert. Anschließend werden die gesammelten organischen Phasen zur Trockne eingedampft.

Die Aufreinigung der nach den Verfahren a und b erhaltenen Produkte erfolgt mittels präparativer HPLC (RP-18/Acetonitril-Wasser)

- 5  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,43 (d, 8H,  $=\text{CH}_{\text{meta}}$ ; 4- $\text{NO}_2$ -Benzyl); 8,15; 8,18 (2d, 8H,  $=\text{CH}_{\text{ortho}}$ ; 4- $\text{NO}_2$ -Benzyl) ppm [Konformerengemisch]

APCI-MS  $m/z$  (%): 1040 ( $\text{MH}^+$ , 13)

**In-vitro-Incorporation von 4-Nitro-phenylmilchsäure:**

- 10 50 -100  $\mu\text{g}$  Enzym werden in 200  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus 4mM Dithiothreitol, 20 % Glycerin und Tris Puffer pH 7,8 für zwei Stunden bei 26°C mit den nachfolgenden Substraten inkubiert:

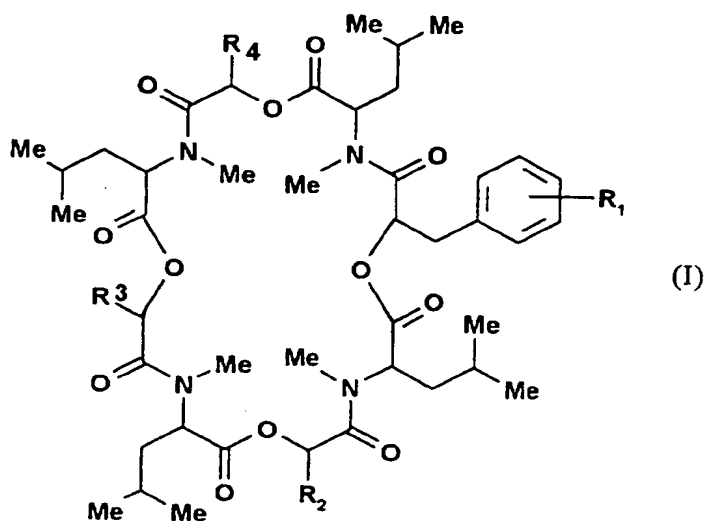
- 5 mM ATP,  
10 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  
2 mM L-Leucin,  
15 0,5 mM S-Adenosyl-L-methionin,  
2 mM D-Milchsäure,  
50-100  $\mu\text{M}$  D-4-Nitro-phenylmilchsäure.

Danach wird der gesamte Reaktionsansatz mit Essigsäureethylester extrahiert und die gebildeten Produkte werden chromatographiert (TLC, HPLC).

- 20 Analog können die in der nachstehenden Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) als LDLDLDD-Stereoisomere hergestellt werden:

**Tabelle 1:**

Beispiele für Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



Bsp.-Nr	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Physikalische Daten
2	4-NO <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-Benzyl	-CH <sub>3</sub>	1017 (M+Na <sup>+</sup> , 3); 1012 (M+H <sub>2</sub> O, 18); 995 (MH <sup>+</sup> , 8) <sup>a)</sup> ; 7,37; 7,43 (2d, 4H, =CH <sub>meta</sub> ; 4-NO <sub>2</sub> -Benzyl); 8,10 (d, 4H, =CH <sub>ortho</sub> ; 4-NO <sub>2</sub> -Benzyl) <sup>b)</sup> 121,5; 123,6 (4xC <sub>ortho</sub> ; 4-NO <sub>2</sub> -Benzyl); 129,3; 130,0 (4xC <sub>meta</sub> ; 4-NO <sub>2</sub> -Benzyl) <sup>c)</sup>
3	4-NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	-Benzyl	-CH <sub>3</sub>	986 (M+Na <sup>+</sup> , 20); 964 (MH <sup>+</sup> , 100) <sup>a)</sup> ; 6,60 (d, 2H, =CH <sub>ortho</sub> ; 4-NH <sub>2</sub> -Benzyl) <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> APCI-MS bzw. EI-MS m/z (%)<sup>b)</sup> <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ in ppm<sup>c)</sup> HMQC-Signale (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ in ppm



## Kultivation, Vorkulturen und Hauptkulturen

### 1. Anzucht auf Agar

Für die Anzucht der Pilzkultur auf *Agar* wird nachfolgendes Medium verwendet:

- Glucose 2,0 %,
- 5    Pepton 1,0 %,
- Hefeextrakt 1,0 %,
- Malzextrakt 1,0 %,
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 %,
- Arar 1,5 %.

- 10    Anschließend erfolgt für 20 Minuten eine Sterilisation bei 121°C.  
     Der pH-Wert des Mediums beträgt nach der Sterilisation  $\approx 7,0$ .

### 2. Flüssigkultur

#### a) Cornsteep / Melasse-Medium:

- 15    Der betreffende Stamm Mycelia sterilia wird in einem Medium bestehend aus  
     Melasse (30 g/l), Cornsteep-Liquor (10g/l) und Glucose (30 g/l) angezüchtet.

Zur Herstellung einer Vorkultur wird das Medium mit Mycel von einer Agarplatte angeimpft und nach ca. 3 Tagen auf einer Schüttelapparatur zum Animpfen für weitere Kolben (Inhalt je 100 ml) mit dem selben Medium verwendet.

#### b) Alternatives Medium:

- 20    Alternativ kann für die Anzucht der Pilzkultur auch nachfolgendes Medium eingesetzt werden:

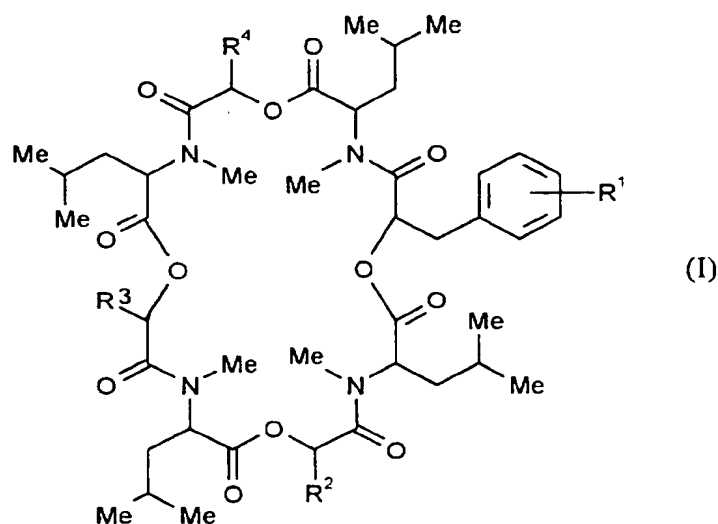
- Weizenkeimextrakt 2,0 %,  
Pharmamedia 1,0 %,  
MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,2 %,  
NaCl 0,2 %, 5  
Stärke 2,6 %,  
Malzsirup 6,0 %,  
CaCO<sub>3</sub> 0,3 %.

Anschließend erfolgt für 20 Minuten eine Sterilisation bei 121°C.  
Der pH-Wert des Mediums beträgt nach der Sterilisation 7,5.

- 10 Für die nachfolgenden Fütterungsversuche werden die betreffenden Precursoren (z.B. 4-Nitrophenylalanin, 4-Nitrophenylmilchsäure, 4-Aminophenylamin, 4-Aminophenylmilchsäure) zu 3 Tage alten Kulturen zugesetzt; die Endkonzentration beträgt 50 mM.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung substituierter Arylmilchsäure-haltiger Cyclopeptide mit 24 Ringatomen mit Hilfe von Pilzstämmen der Art Agonomycetales oder daraus isolierten enzymatischen Präparationen.
- 5 2. Verfahren zur Herstellung von substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptiden mit 24 Ringatomen der allgemeinen Formel (I)



in welcher

- 10  $R^1$  für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, cyclisches Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkenyloxy, Arylalkoxy, Cycloalkoxy, Alkylamino, Di-alkylamino, Alkylcarbonyl, Alkylcarbonyloxy, Alkoxy-carbonyl, Alkylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, Heteroarylcarbonyl, Alkoxy-sulfonyl, Alkylaminosulfonyl, Dialkylaminosulfonyl, Alkyl-thio, Alkylsulfinyl, Alkylsulfonyl, Heteroarylsulfonyl, die gegebe-
- 15 nenfalls substituiert sein können, Hydroxy, Halogen, Nitro, Amino, Carboxyl, Carbamoyl, Cyano oder gegebenenfalls für substituierte cyclische Aminogruppen, steht, und

- 20  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Heteroarylmethyl oder für einen Benzylrest stehen, der gegebenenfalls durch Reste aus der Reihe Wasserstoff, geradkettiges

5

oder verzweigtes Alkyl, cyclisches Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkenyloxy, Arylalkoxy, Cycloalkoxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkylcarbonyl, Alkylcarbonyloxy, Alkoxy carbonyl, Alkylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, Heteroarylcarbonyl, Alkoxy sulfonyl, Alkylaminosulfonyl, Dialkylaminosulfonyl, Alkylthio, Alkylsulfinyl, Alkylsulfonyl, Heteroarylsulfonyl, die gegebenenfalls substituiert sein können, Hydroxy, Halogen, Nitro, Amino, Carboxyl, Carbamoyl, Cyano oder der gegebenenfalls durch eine geeignete cyclische Aminogruppe substituiert ist, steht,

10

mit Ausnahme der Verbindungen der Formel (I), in welcher

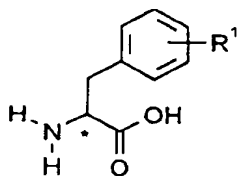
$R^1$  für 4-Hydroxy steht,

$R^3$  für unsubstituiertes Benzyl steht

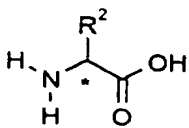
und die übrigen Reste die oben genannte Bedeutung haben, dadurch gekennzeichnet, daß man

15

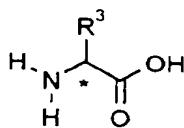
a) optisch aktive oder racemische Aminosäuren der allgemeinen Formeln (II), (III), (IV) und (V)



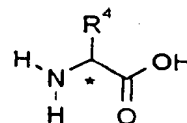
(II)



(III)



(IV)



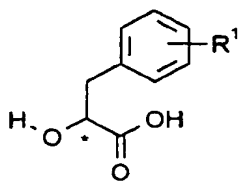
(V)

worin

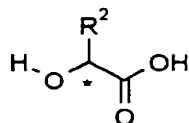
20

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  die oben angegebene Bedeutung haben, oder

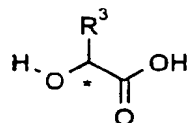
b) optisch aktive oder racemische 2-Hydroxy-carbonsäuren der allgemeinen Formeln (VI), (VII), (VIII) und (IX)



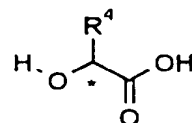
(VI)



(VII)



(VIII)



(IX)

worin

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  die oben angegebene Bedeutung haben,

- 5 in Gegenwart von Pilzstämmen der Art *Agonomycetales* in geeigneten Nährlösungen oder in Gegenwart von aus diesen Pilzstämmen isolierten Synthetasen in einem Puffersystem umgesetzt und anschließend die gewünschten, substituierten Arylmilchsäure-haltigen Cyclodepsipeptide mit 24 Ringatomen isoliert.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No  
PCT/EP 96/05190A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12P17/14 //C07D273/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 382 173 A (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD., JAPAN) 16 August 1990 cited in the application	1
Y	see page 4, line 1 - line 17; claims ---	2
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9431 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 94-252800 XP002026183 & JP 06 184 126 A (MEIJI SEIKA KAISHA) , 5 July 1994 cited in the application	1
Y	see abstract --- -/--	2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 1997

Date of mailing of the international search report

05.03.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 96/05190

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 7, 17 August 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 62356, SASAKI, TORU ET AL: "A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A" XP002026182	1
Y	see abstract & J. ANTIBIOT. (1992), 45(5), 692-7 CODEN: JANTAJ;ISSN: 0021-8820, ----	2
Y	EP 0 288 087 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK) 26 October 1988 see claims ----	2
A	BIOSCI., BIOTECHNOL., BIOCHEM. (1993), 57(1), 98-101 CODEN: BBBIEJ, XP002026181 KAWAZU, KAZUYOSHI ET AL: "Isolation and characterization of two novel nematocidal depsipeptides from an imperfect fungus, strain D1084" -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No  
PCT/EP 96/05190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0382173 A	16-08-90	AT 131161 T	15-12-95
		AU 620689 B	20-02-92
		AU 4921590 A	16-08-90
		CA 2009508 A	07-08-90
		CN 1046940 A,B	14-11-90
		DE 69023934 D	18-01-96
		DE 69023934 T	14-08-96
		ES 2083392 T	16-04-96
		JP 3035796 A	15-02-91
		NO 176766 B	13-02-95
		US 5116815 A	26-05-92
EP 0288087 A	26-10-88	CA 1292200 A	19-11-91
		DE 3853092 D	30-03-95
		DE 3853092 T	10-08-95
		JP 1027493 A	30-01-89
		US 4879223 A	07-11-89



# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

In:  Aktenzeichen  
PCT/EP 96/05190

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12P17/14 //C07D273/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 6 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 382 173 A (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD., JAPAN) 16. August 1990 in der Anmeldung erwähnt	1
Y	siehe Seite 4, Zeile 1 - Zeile 17; Ansprüche	2
	---	
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9431 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 94-252800 XP002026183 & JP 06 184 126 A (MEIJI SEIKA KAISHA), 5. Juli 1994	1
Y	in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung	2
	---	
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- \* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05.03.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Delanghe, L

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 7, 17.August 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 62356, SASAKI, TORU ET AL: "A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A" XP002026182	1
Y	siehe Zusammenfassung & J. ANTIBIOT. (1992), 45(5), 692-7 CODEN: JANTAJ;ISSN: 0021-8820, ---	2
Y	EP 0 288 087 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK) 26.Oktober 1988 siehe Ansprüche ---	2
A	BIOSCI., BIOTECHNOL., BIOCHEM. (1993), 57(1), 98-101 CODEN: BBBIEJ, XP002026181 KAWAZU, KAZUYOSHI ET AL: "Isolation and characterization of two novel nematocidal depsipeptides from an imperfect fungus, strain D1084" -----	1

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

l: Aktenzeichen  
PCT/EP 96/05190

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0382173 A	16-08-90	AT 131161 T	15-12-95
		AU 620689 B	20-02-92
		AU 4921590 A	16-08-90
		CA 2009508 A	07-08-90
		CN 1046940 A,B	14-11-90
		DE 69023934 D	18-01-96
		DE 69023934 T	14-08-96
		ES 2083392 T	16-04-96
		JP 3035796 A	15-02-91
		NO 176766 B	13-02-95
		US 5116815 A	26-05-92
EP 0288087 A	26-10-88	CA 1292200 A	19-11-91
		DE 3853092 D	30-03-95
		DE 3853092 T	10-08-95
		JP 1027493 A	30-01-89
		US 4879223 A	07-11-89